昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2006, 49(1):118 - 125　　ISSN 0454-6296

果蝇蜕皮激素诱导程序性细胞死亡的遗传调控因子

李庆荣[1]，**邓小娟**[1]，**杨婉莹**[1]，**黄志君**[1]，**钟仰进**[1]，**曹　阳**[1*]，**夏庆友**[2]

(1. 华南农业大学蚕学分子生物学与生物技术实验室，广州　510642；2. 西南大学，农业部蚕桑学重点实验室，重庆　400716)

摘要：近年来关于果蝇程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)的研究结果表明，在果蝇的变态发育过程中，蜕皮激素与受体结合后诱导转录因子的表达。这些转录因子作为程序性细胞死亡调控网络中的初、次级应答信号，激活凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 的表达。Reaper、Hid 和 Grim 进而阻止凋亡蛋白抑制因子的活性，从而启动半胱氨酸蛋白酶 caspase 途径，引起细胞凋亡(apoptosis)。该文综述了蜕皮激素诱导的果蝇程序性细胞死亡中各遗传调控因子之间的关系。

关键词：果蝇；蜕皮激素；蜕皮酮；程序性细胞死亡；细胞凋亡；遗传调控因子

中图分类号：Q965.9　　文献标识码：A　　文章编号：0454-6296(2006)01-0118-08

Genetic regulators involved in ecdysone-induced programmed cell death in *Drosophila*

LI Qing-Rong[1], DENG Xiao-Juan[1], YANG Wan-Ying[1], HUANG Zhi-Jun[1], ZHONG Yang-Jin[1], CAO Yang[1*], XIA Qing-You[2] (1. Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Key Laboratory of Sericulture of the Ministry of Agriculture, Southwest China University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Recent reports on programmed cell death (PCD) (or apoptosis) in *Drosophila* reveal that during metamorphosis, binding of ecdysone to the complex of ecdysone receptor and ultraspiracle results in expression of the transcription factors that are primarily and secondarily responsive to PCD signals in the regulatory networks. These transcription factors activate the expression of inducers (Reaper, Hid, and Grim) of apoptosis and the activated inducers suppress activity of inhibitors of apoptosis proteins, resulting in onset of the caspase-dependent apoptosis. The genetic regulators that are involved in the ecdysone-induced programmed cell death in *Drosophila* and their relationship between each other were reviewed in this article.

Key words: *Drosophila*; molting hormone; ecdysone; programmed cell death; apoptosis; genetic regulator

与昆虫发育直接相关的激素主要有两大类：一类是由前胸腺(prothoracic gland，又称蜕皮腺 ecdysial gland)分泌的蜕皮激素(molting hormone)，它调控与幼虫蜕皮、化蛹和成虫羽化相关的生长和分化等；另一类是由咽侧体(corpus allatum)分泌的保幼激素(juvenile hormone)，它主要抑制蜕皮激素调节的各种活动，协调控制幼虫蜕皮的发育方向。

程序性细胞死亡(programmed cell death)，又称细胞凋亡(apoptosis)，是生物个体发育过程中的一个重要事件，是细胞接受到某种信号或者刺激后，对信号响应而主动消亡的过程。在果蝇 *Drosophila* 的变态发育过程中，幼虫组织在蛹期因发生程序性细胞死亡而退化，至成虫期完全消失。近年来的研究表明，有大量的转录因子(transcription factor)和调控蛋白因子参与了对该过程的调控，例如蜕皮激素-受体复合物，转录因子 DHR3、βFTZ-F1、BR-C、E74、E93 和 E75 等，凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim，凋亡蛋白抑制因子 DIAPs (inhibitor of apoptosis protein in *Drosophila*)以及半胱氨酸蛋白酶 caspases 家族成员等，它们相互作用、依次调控着果蝇程序性细胞死亡的启动和进程(图 1)。本文综述了果蝇蜕皮激素诱导程序性细胞死亡中各遗传调控因子及其之间的关系 (文中斜体缩写符号表示基因名称，对应的正体缩写符号表示由该基因表达的蛋白质因子)。

基金项目：国家重点基础研究发展规划'973'项目(2005CB121000)；国家自然科学基金项目(30370716, 30570938)

作者简介：李庆荣，1977 年 2 月生，博士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail: xiaodaiyang@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: caoyang@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-02-22；接受日期 Accepted: 2005-07-04

1　果蝇的蜕皮激素及其受体

固醇类激素蜕皮酮(ecdysone)在昆虫的变态发育中诱导细胞的凋亡。蜕皮激素受体是由 ECR/USP (ecdysone receptor/ultraspiracle) 异二聚体形成的核受体。编码果蝇蜕皮激素受体 EcR 的基因可以表达 3 种在 N 末端有差异的同工型蛋白因子：EcR-A、EcR-B1 和 EcR-B2。由于 N 末端不是 DNA 结合区,也不是配体结合区,因而不影响它们作为蜕皮激素受体的功能。在果蝇等昆虫的变态发育中,这些同工型蛋白因子表达的时间和组织位点具有特异性,在虫体各组织中的含量也不一样(Schubiger *et al*., 2003),例如在处于退化状态的幼虫组织和神经元中含有大量的 EcR-B1,而在处于分化状态的成虫盘和神经元中则含有比较多的 EcR-A。这可能暗示不同的 EcR 受体亚型与蜕皮激素结合后可能激活不同位点基因的表达,引导各类组织的不同发育方向(张红卫,2001)。

2　蜕皮激素受体调控的初、次级反应基因

蜕皮激素与受体 EcR/USP 结合后,调控多个初、次级反应的基因,包括 *DHR*3、*βFTZ-F*1、*BR-C* (*Broad-complex*)、*E*74、*E*93 和 *E*75 等的表达。所有

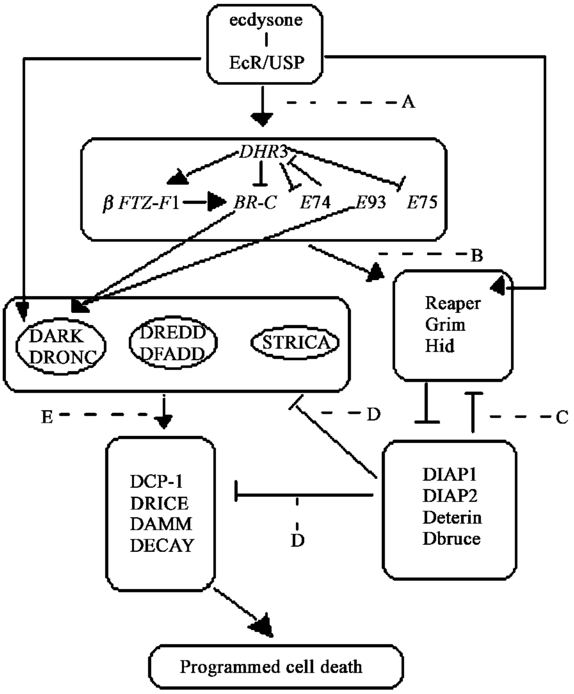

图 1　蜕皮激素诱导果蝇程序性细胞死亡的遗传调控网络图

Fig. 1　Heredity regulation during ecdysone-induced programmed cell death in *Drosophila*

A. 变态发育过程中，蜕皮激素结合 EcR/ USP 受体形成复合物，激活了一系列初、次级反应基因如 *DHR*3、*βFTZ-F*1、*BR-C*、*E*74、*E*93、*E*75 等转录因子基因的表达，该受体复合物还可以分别与 *reaper*、*DRONC* 基因的调控区结合，促进它们的转录。During metamorphosis, ecdysone binds to its heterodimeric receptor consisting of ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP), forming a hormone-receptor complex, which activates expression of a series of primarily and secondarily responding genes, such as *DHR*3, *βFTZ-F*1, *BR-C*, *E*74, *E*93 and *E*75, of transcription factors. The complex also enhances transcription of *reaper* and *DRONC* genes by binding to their regulatory domains.

B. 初、次级反应基因的表达产物作为转录因子，激活凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 的转录表达。此外 *BR-C* 和 *E*93 的表达产物还可以作为 *DRONC* 的正调控因子，促进它的转录。The transcription factors from the expression of primarily and secondarily responding genes activate expression of the inducers, such as Reaper, Hid and Grim, of apoptosis. The products of *BR-C* and *E*93 can up-regulate the transcription of *DRONC*.

C. Reaper、Hid 和 Grim 通过与凋亡蛋白抑制因子 DIAPs (DIAP1、DIAP2、Deterin 和 Dbruce) 结合或者降低其胞内浓度抑制 DIAPs 的功能,激活 caspase 途径。Inducers (Reaper, Hid and Grim) of apoptosis suppress the inhibitors of apoptosis proteins (DIAP1, DIAP2, Deterin and Dbruce) by either binding to these proteins or decreasing their concentrations inside cells, resulting in activation of the caspase pathway.

D. 凋亡蛋白抑制因子 DIAPs 抑制果蝇 caspase 途径。DIAPs suppress the activation of caspase pathway in *Drosophila*.

E. 上游 caspase 成员 DRONC、DREDD 和 STRICA 活化效应 caspase 成员 DCP-1、DRICE、DAMM 和 DECAY，由此引发了果蝇变态发育过程中的程序性细胞死亡。The messenger members (DRONC, DREDD and STRICA) of the caspase pathway activate the effector members (DCP-1, DRICE, DAMM and DECAY), resulting in programmed cell death during metamorphosis in *Drosophila*.

箭头表示正控制(激活)作用,短横线表示负控制(抑制)作用。The arrowheads indicate up-regulation (activation), the short lines indicate down-regulation (inhibition).

这些初、次级反应基因的表达产物均为转录因子，它们进一步激活细胞凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 基因以及半胱氨酸蛋白酶 caspases 家族上游成员 DRONC 基因的转录（图 1）。

*DHR*3 位于蜕皮激素诱导的早晚期染色体胀泡 46F 区，编码一个核受体蛋白。在蜕皮激素诱导果蝇程序性细胞死亡的调控网络中，*DHR*3 接受 MH-EcR/USP 受体复合物的激活，其基因表达产物行使正负两种调控功能：诱导 *βFTZ-F*1 的表达并且抑制 *BR-C* 和 *E*74*A*、*E*75*A* 的表达（Carney *et al*.，1997）（图 1）。

βFTZ-F1 是果蝇变态发育过程中蜕皮激素反应的一个特异性因子，是蛹前中期的一个关键性转录因子，它与果蝇同源异形蛋白 Ftz（fushi tarazu）以异二聚体形式发挥作用（Yussa *et al*.，2001）。它的高水平表达可以提高 *BR-C*、*E*74 和 *E*75 的转录水平以及导致 *E*93 的过早表达（Woodard *et al*.，1994）。

BR-C 编码一个含锌指结构的转录因子家族。该家族有 4 种蛋白因子，都含有一个独特的 C_2H_2 “锌指”结构，其 N 末端有一个进化上保守的 BTB/POZ 区域，为蛋白-DNA 相互作用的区域。这个结构在其他的含锌指结构的 DNA 结合蛋白中也有发现（DiBello *et al*.，1991）。对 *BR-C* 的突变实验表明，BR-C 在幼虫组织的凋亡和成虫组织的建成方面起着非常重要的作用（Deng and Bownes，1997），例如，它对于果蝇凋亡诱导因子基因 *reaper* 和 *hid* 的转录以及果蝇半胱氨酸蛋白酶 caspases 家族上游成员 DRONC 的活化起正调控作用（Jiang *et al*.，2000）（图 1）。

*E*74 编码 ETS-like 转录因子，表达 A、B 两种同工型，在 ETS 的 C 末端都有一个与 DNA 结合的结构域，此外，ETS-like 转录因子还有一个独特的 N 末端序列（Fletcher *et al*.，1997）。*E*74 具有反馈调控自身转录的功能，在果蝇凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 基因表达的时间调控中起着重要作用（Huet *et al*.，1995）。实验证实，*E*74 正调控 *hid* 的活性，但它的异位表达可以部分地抑制（负控制）*E*78*B* 和 *DHR*3 基因（Jiang *et al*.，2000）（图 1）。

*E*93 位于多线染色体的早期胀泡 93F 区，至少由 55 kb 的碱基组成，编码一个大约 146 kD 的蛋白，是果蝇变态发育中另一个重要的转录因子（Baehrecke and Thummel，1995）。突变实验表明，*E*93 突变后，幼虫丝腺不能发生程序性细胞死亡（Lee *et al*.，2000）。

*E*75 编码 *A*、*B*、*C* 3 种同工型核受体家族成员，它们是 *E*75 从不同启动子选择性转录表达的产物。*E*75 的蛋白产物调控下游基因的表达，其中 A、B 型抑制凋亡蛋白抑制因子 DIAP2 的表达（Jiang *et al*.，2000）。同时 *E*75 在蛹变态期还接受保幼激素的诱导，在幼虫蜕皮过程中启动保幼激素 *Jhl*-21 基因的活性（Dubrovsky *et al*.，2004）。换句话说，蜕皮激素和保幼激素都可诱导 *E*75*A* 的表达，但其表达产物 E75A 在幼虫蜕皮和蛹变态期调控不同基因的表达。

3 凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 蛋白

在果蝇中凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 是细胞凋亡发生所必须的。它们整合和转换许多不同的细胞死亡信号，阻止果蝇中凋亡蛋白抑制因子的功能，激活细胞凋亡的半胱氨酸蛋白酶 caspase 途径。*reaper*、*hid* 和 *grim* 分别位于果蝇 3 号染色体的 75CI1、2 基因座中，其中 *reaper* 编码 65 个氨基酸残基、*hid* 编码 410 个氨基酸残基、*grim* 编码 138 个氨基酸残基（Grether *et al*.，1995；Chen *et al*.，1996；White *et al*.，1996）。

果蝇凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 的作用机制是保守的：首先，它们中的任何一个在哺乳动物细胞中都可以诱导凋亡，这说明它们在功能进化上的保守性；第二，它们彼此的同源区很低，却都可以与几个不同的果蝇凋亡蛋白抑制因子 DIAP1、DIAP2、Deterin 或 Dbruce 相互作用（McCarthy and Dixit，1998；Haining *et al*.，1999）。昆虫的凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 与哺乳动物的凋亡诱导因子 Smac 和 HtrA2 几乎没有同源性，但是它们在靠近 N 末端都有一个大约 14 个氨基酸残基的序列，能够与果蝇凋亡蛋白抑制因子或哺乳动物凋亡蛋白抑制因子结合（Lisi *et al*.，2000；Yin and Thummel，2004），阻断凋亡蛋白抑制因子的抑制功能，诱导依赖半胱氨酸蛋白酶 caspase 途径的细胞凋亡（图 1），这表明果蝇凋亡诱导因子的 N 端结构是其特异性所必需的。这一结论得到了遗传学和生物化学的实验证实：果蝇体内的凋亡蛋白抑制因子能阻止细胞内 caspase 的诱导活性，Reaper、Hid 和 Grim 则可以与 DIAP1 形成复合体，阻断其抑制功能，打开 caspase 途径（Vucic *et al*.，1997，1998）。

虽然凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 可以各自独立地诱导果蝇细胞凋亡，但是它们的作用机制并不相同（Yoo *et al*.，2002）。有报道证实，Grim 的 N 末端可以抑制果蝇凋亡蛋白抑制因子的活性，而

内部的 GH3 结构域则可以激活哺乳动物细胞中线粒体的凋亡(Claveria *et al*., 2004)。Reaper 不仅抑制果蝇凋亡蛋白抑制因子 DIAP1 的活性,在哺乳动物细胞内它还可以通过激活凋亡蛋白抑制因子的降解或抑制其翻译来降低细胞内凋亡蛋白抑制因子的含量(Holley *et al*., 2002)。分析 Reaper 结构与功能的关系,发现它有一个与 Grim 相似的 GH3 结构域,它的功能与 Grim 的 GH3 结构域相似,对自身在线粒体的定位和激活凋亡蛋白抑制因子的降解发挥作用(Olson *et al*., 2003a)。还有报道表明,在果蝇的发育进程中,*reaper* 和 *grim* 仅在将要死亡的细胞中表达,而 *hid* 可以在正常存活的细胞中表达(Bergmann *et al*., 1998),并且 Hid 的活化可以受到蛋白激酶 MAPK 途径的抑制,Reaper 和 Grim 的活化却不受这一途径的影响。

果蝇凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 也可以与非洲爪蟾属 *Xenopus* 的 Scythe 蛋白作用。Scythe 在脊椎动物中是高度保守的,在其 N 末端附近含有一个拟泛素结构域。Reaper 与 Scythe 的相互作用导致了一个与 Scythe 结合的凋亡因子前体的释放,该凋亡因子又进一步促进了线粒体细胞色素 c 的释放,其结果是所在细胞和细胞内的线粒体均发生凋亡;Scythe 的缺失可以阻止 Reaper 诱导的细胞凋亡(Thress *et al*., 1998)。果蝇也编码一个 Scythe 的同族体,暗示也可能存在一个类似的 Scythe-凋亡因子前体/细胞色素 c 途径(Thress *et al*., 1998)。

4　半胱氨酸蛋白酶家族成员的活性

广泛存在于动物、植物和微生物中的半胱氨酸蛋白酶在细胞凋亡中扮演了非常重要的角色。对包括线虫、脊椎动物和果蝇细胞凋亡的研究表明,具有半胱氨酸蛋白酶结构特征的半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员是所有动物发生细胞凋亡的信号传递中心。通常认为,半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员像许多酶蛋白一样,合成后以无活性的酶原形式(caspase 前体)存在于所有的细胞中,当它们被激活时,在一个或者多个天冬氨酸残基或者谷氨酸残基构成的肽键处断裂,促使半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员多肽的寡聚化而活化。一旦被活化,半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员就激活多种效应蛋白或者直接作为水解酶蛋白酶引发细胞内的水解级联反应,导致细胞凋亡。

半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员在细胞凋亡中传递细胞产生的死亡信号,使大量的细胞蛋白(酶或活性因子)活化或者失活。半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员分为两大类。一类作为信号转换者,又称为上游 caspase 或者信使 caspase,多含有很长的前端结构。这些区域含有特定的修饰序列,又称为死亡效应结构域(death effect domain)或 caspase 募集结构域(caspase recruitment domain),它可以使 caspase 成员募集形成复合体。另一方面,caspase 成员的活性是与其自身的寡聚化相一致的,一旦被活化,上游 caspase 长的前端结构被断裂成短的前端结构(熊世勤和朱锡华,2000)。在哺乳动物和果蝇中进行的突变实验结果还表明,caspase 成员可能在细胞的非凋亡过程中也扮演了重要的角色(Huh *et al*., 2004),但是目前对许多 caspase 成员的特定功能还不是很清楚。在 caspase 家族成员中,另一类是不具有长的前端结构(包括位于其中的募集结构域),属于效应 caspase,它们接受那些具长的前端结构的上游 caspase 成员的活化调控。

目前已在果蝇基因组中发现了 7 个 caspase 成员:DRONC、DREDD、STRICA、DRICE、DCP-1、DAMM 和 DECAY。这些 caspase 成员中大多已经被证明在细胞凋亡中发挥作用(Fraser *et al*., 1997;Song *et al*., 1997;Chen *et al*., 1998;McCall and Steller, 1998;Dorstyn *et al*., 1999;Quinn *et al*., 2000;Doumanis *et al*., 2001;Harvey *et al*., 2001)。其中有 3 种 caspase 成员(DRONC、DREDD 和 STRICA)含有包括募集结构域在内的长的前端结构,是上游 caspase。而其他 4 种 caspase 成员则没有长的前端结构,是受到上游 caspase 活化的效应 caspase 成员(图 1)。

DRONC 是一个与线虫 CED-3、哺乳动物caspases 9 凋亡因子相似的上游 caspase,含有一个 caspase 募集结构域。DRONC 可以断裂 Glu 或者 Asp 形成的肽键,它的作用底物具有特异性。跟哺乳动物的 caspase2 类似,DRONC 偏好一个 4 肽的底物序列,在这个序列中,第 2 个氨基酸位置多为脂肪族类氨基酸残基,而第 1 个氨基酸则是 Glu 或者 Asp 残基(Hawkins *et al*., 2000)。DRONC 在由 Reaper、Hid 和 Grim 凋亡诱导因子引起的果蝇程序性细胞死亡中起关键作用,它的转录表达和活性调控非常复杂。已经确认 BR-C、E93 是调控 DRONC 表达的主要转录因子,它们可以与 DRONC 基因的启动子区域相互作用(Lee *et al*., 2000;Cakouros *et al*., 2002;Daish *et al*., 2003)。最近有报道指出,蜕皮激素受体 EcR/USP 也可以与 DRONC 基因的启动子结合,在特定的组织中调控 DRONC 基因的表达(Cakouros *et*

al., 2004)。DRONC 还可以与连接蛋白 DARK 通过募集结构域相互作用形成复合体,调控自身 DRONC 的活性。此外,DRONC 可以不依赖其他 caspase 成员的活性传递凋亡信号,引起细胞凋亡(Igaki *et al*., 2002)。

哺乳动物的凋亡促进因子 Apaf-1 和线虫的凋亡促进因子 CED-4 分别在哺乳动物和线虫中启动半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员的表达。在哺乳动物中,细胞色素 c 可在各类细胞死亡信号的刺激下,从线粒体中释放到胞质溶胶中,激发一系列的半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员引发蛋白水解级联反应,其中 Caspase9 的活化就是在细胞色素 c 存在的条件下由凋亡促进因子 Apaf-1 使其寡聚化而实现的。果蝇的 DARK 则是 Apaf-1 和 CED-4 的同源蛋白(Rodriguez *et al*., 1999),它是果蝇上游 caspase 成员 DRONC 的连接蛋白和凋亡促进因子,与 DRONC 前体结合,促使其寡聚化而活化(图 1)。

DREDD 是果蝇凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 诱导活化的另一个上游 caspase 成员(Chen *et al*., 1998)。同样,凋亡促进因子 DFADD 是果蝇 DREDD 的连接蛋白,它与 DREDD 前体结合,使之寡聚化而活化(图 1)。DFADD 中含有一个跟哺乳动物凋亡促进因子(连接蛋白)FADD 高度同源的死亡结构域(death domain),同时含一个死亡诱导结构域(death-inducing domain),通过其死亡诱导结构域与 DREDD 结合,促进和稳定 DREDD 的活化(Hu and Yang, 2000)。此外 DREDD 除了在果蝇的程序性细胞死亡中发挥作用外,在机体抵制由革兰氏阴性细菌引起的感染中也发挥重要的作用,这也可以作为一个重要例证:在半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族中,有的成员同时在非凋亡过程中发挥某些作用(Leulier *et al*., 2000)。

果蝇另一个上游 caspase 成员 STRICA 则没有 caspase 募集结构域,它的前端结构中含有一个独特的富含 Ser/Thr 的序列。STRICA 可以与果蝇的凋亡蛋白抑制因子 DIAP1、DIAP2 相互作用,在果蝇的变态发育中可能有另外的细胞学功能(Doumanis *et al*., 2001)。

除了 DARK、DFADD 两个连接蛋白(凋亡促进因子)外,在果蝇基因组还有另一个与哺乳动物的凋亡促进因子 Apaf-1 和线虫的凋亡促进因子 CED-4 同源的 Dapaf-1 序列,它也与果蝇的 caspase 相互作用。*dapaf*-1 基因转录的 mRNA 经过选择性剪接,产生 2 个 mRNA 片段,表达为 2 种截然不同的 caspases 活化蛋白:(1) Dapaf-1L(Apaf-1 型),它含有一系列的 COOH 末端 WD-40 重复序列,可能参与依赖细胞色素 c 途径的细胞凋亡;(2) Dapaf-1S(CED-4 型),没有 WD-40 的重复序列。不同的 Dapaf-1S 同工型可以活化不同的 caspase 成员(Kanuka *et al*., 1999)。

DCP-1 和 DRICE 是 2 个非常相似的果蝇效应 caspase 成员,具有 57% 的序列相似性,没有长的前端结构。DCP-1 与哺乳动物 caspase3 和线虫凋亡因子 CED-3 的底物特异性相似,具有自我切除的活性。DCP-1 在果蝇蛹变态发生的程序性细胞死亡中可能直接清除凋亡目标或者活化其他的 caspase 前体,引起细胞凋亡,在果蝇卵子发生期诱导滋养细胞的凋亡也具有重要的作用。此外果蝇 DCP-1 还可以引起哺乳动物细胞的凋亡,这表明它在细胞凋亡功能上的保守性(Song *et al*., 1997;McCall and Steller, 1998)。在果蝇体内,DCP-1 只能被由凋亡诱导因子 Reaper 或 Grim 诱导的程序性细胞死亡机制激活,而 DRICE 在所有死亡刺激信号引起的程序性细胞死亡过程中都可以被激活。DRICE 的活性可以被凋亡蛋白抑制因子 DIAP1 抑制(Yan *et al*., 2004)。DRICE 在体外可以断裂杆状病毒 P35 蛋白(一种具有广谱抗凋亡效应的蛋白,几乎抑制所有动物的 caspase 成员的活性)和核纤层蛋白 DmO(Fraser *et al*., 1997)。

果蝇 DAMM 也属于效应 caspase(图 1),缺乏一个长的前端结构,在凋亡过程中由上游 caspase 或其他 caspase 成员水解使其活化。它本身具有很好的水解活性,其底物是一个 caspase 五肽序列。研究证明 DAMM 突变不会影响由凋亡诱导因子 Reaper 和上游 caspase 成员 DRONC 引起的细胞死亡,但是它在由凋亡诱导因子 Hid 诱导的程序性细胞死亡中发挥作用(Harvey *et al*., 2001)。

5 果蝇凋亡蛋白抑制因子对程序性细胞死亡的调控

程序性细胞死亡是机体清除冗余的或损伤的细胞,维持机体正常生活状态的一种主动的细胞死亡方式。在正常生活的细胞中,程序性细胞死亡过程受到严格的控制。大量的遗传学和生物化学的证据表明,凋亡蛋白抑制因子对依赖于半胱氨酸蛋白酶 caspase 活性的程序性细胞死亡过程进行的抑制,是维持细胞存活所必须的(Wang *et al*., 1999)。如前所述,在果蝇的程序性细胞死亡调控网络中,通常情况下细胞凋亡的通路受到凋亡蛋白抑制因子的阻断,因此果蝇凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 激活细胞凋亡的机制,主要是对果蝇凋亡蛋白抑制因子

的功能进行抑制（Vucic *et al*.，1997，1998）（图 1）。

凋亡蛋白抑制因子是一系列高度保守的抗凋亡基因家族的表达产物，可以保护特定的细胞抵抗一系列刺激源诱导的细胞凋亡。凋亡蛋白抑制因子首先在杆状病毒中分离得到，这些蛋白含有几个位于 N 端的约 70 个氨基酸残基序列的重复，称为杆状病毒 IAP 重复（BIR），并且大部分凋亡抑制蛋白因子的 C 端还含有锌指结构域。

果蝇基因组编码 4 个含有 BIR 的凋亡蛋白抑制因子 DIAP1、DIAP2、Deterin 和 Dbruce，可以在果蝇程序性细胞死亡的不同途径中发挥作用。DIAP1 通过其 N 端的第 2 个 BIR 区（BIR2）识别上游 caspase 成员 DRONC 的一个 12 个氨基酸残基的序列，与之结合后使 DRONC 泛素化水解（Chai *et al*.，2003），从而抑制依赖 DRONC 的细胞凋亡，DIAP1 的 C 端锌指结构参与了这一过程（Wilson *et al*.，2002）。此外，DIAP1 还可以与 DRONC 的前端结构相互作用，抑制 DRONC 前体的活化（Meier *et al*.，2000）。最近有研究证实，DIAP1 对效应 caspases 成员 DRICE 的抑制是通过它的 BIR1 结构域与活化后的 DRICE 结合，抑制 DRICE 的催化活性（Yan *et al*.，2004）。另外，已经证实果蝇凋亡蛋白抑制因子不仅抑制半胱氨酸蛋白酶 caspase 家族成员的活性，还对凋亡诱导因子 Reaper、Hid 和 Grim 发挥调控作用：Reaper、Hid 和 Grim 可以使果蝇凋亡蛋白抑制因子泛素化降解；反过来，凋亡蛋白抑制因子也可以使 Reaper、Hid 和 Grim 泛素化，在此过程中凋亡蛋白抑制因子还具有泛素连接酶的活性（Olson *et al*.，2003b）。

果蝇凋亡蛋白抑制因子 Deterin 的结构与 DIAP1 和 DIAP2 不同，只有一个单独的 BIR 区，而且 C 端没有锌指结构域，但有一个 α 螺旋，α 螺旋在 Deterin 抑制的细胞凋亡中发挥作用（Jones *et al*.，2000）。果蝇凋亡蛋白抑制因子 Dbruce 含有一个 BIR 和一个 C 端的泛素连接区，已经证实 Dbruce 在由 Reaper 和 Grim 诱导的细胞凋亡中有抑制作用，但是还不清楚它在由 Hid 诱导的细胞凋亡中发挥什么作用（Vernooy *et al*.，2002）。

6　问题与展望

程序性细胞死亡是发育生物学、细胞生物学和分子生物学研究的重要课题之一。果蝇作为一种模式生物，用它探讨昆虫乃至其他动物生命现象中各种基本问题的研究已经非常深入。因此阐明果蝇在变态发育过程中蜕皮激素诱导细胞凋亡的遗传调控机制，可以为人们理解昆虫的变态发育和程序性细胞死亡提供一个基本的模式，将对其他昆虫包括一些农业害虫以及经济昆虫的相关研究提供非常好的借鉴。

例如，对果蝇蜕皮激素诱导下程序性细胞死亡机制的研究，同时促进了对家蚕的相关研究。1994～2004 年以来，日本、美国、加拿大和希腊等实验室先后鉴定到与果蝇细胞凋亡调控网络中平行的家蚕蜕皮激素受体基因 *EcR-B*1（Swevers *et al*.，1995；Kamimura *et al*.，1996）、转录因子基因 *BmHR*3（Matsuoka and Fujiwara，2000；Eystathioy *et al*.，2001）、*BmFTZ-F*1（Sun *et al*.，1994）、*BR-C*（Ijiro *et al*.，2004；Nishita and Takiya，2004；Reza *et al*.，2004）、*E*74（Mita *et al*.，2003）、*E*75（Matsuoka and Fujiwara，2000；Swevers *et al*.，2002）和凋亡蛋白抑制因子基因 *BIAP*（Huang *et al*.，2001）及部分 caspase 成员，但未见家蚕基因组中有相似于果蝇细胞凋亡调控网络中 *Reaper*、*Hid* 和 *Grim* 功能的家蚕凋亡诱导因子基因的报道。

2003 年西南农业大学等单位完成了对家蚕 *Bombyx mori* 基因组的全测序和基因框图的绘制（Xia *et al*.，2004），分析表明家蚕基因组有 18 510 个完整基因，其中 6 000 个为新基因，2 500 多个是与果蝇和其他昆虫共有的已知基因序列，1 700 多个为家蚕所特有的基因。注释结果同样未发现在家蚕基因组中有类似于果蝇 Reaper、Hid 和 Grim 的家蚕凋亡诱导因子的基因序列，这就为今后研究家蚕的细胞凋亡机制提供了一个非常好的切入点。

致谢　特别感谢原加拿大 Great Lakes Forestry Centre 资深研究员、现华南师范大学生命科学学院教授、昆虫分子生物学家冯启理博士对全文进行的修改。

参考文献（References）

Baehrecke EH，Thummel CS，1995. The *Drosophila E*93 gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. *Dev*. *Biol*.，171（1）：85－97.

Bergmann A，Agapite J，McCall K，Steller H，1998. The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell*，95：331－341.

Cakouros D，Daish TJ，Martin D，Baehrecke EH，Kumar S，2002. Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in *Drosophila* is regulated by Broad-Complex. *The Journal of Cell Biology*，157（6）：985－996.

Cakouros D，Daish TJ，Kumar S，2004. Ecdysone receptor directly binds the promoter of the *Drosophila* caspase dronc，regulating its expression in specific tissues. *J*. *Cell Biol*.，165（5）：631－640.

Carney GE，Wade AA，Sapra R，Goldstein ES，Bender M，1997. DHR3，an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor，is required for embryogenesis. *Genetics*，94(22)：12 024 – 12 029.

Chai J，Yan N，Huh JR，Wu JW，Li W，Hay BA，Shi Y，2003. Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. *Nat. Struct. Biol.*，10(11)：892 – 898.

Chen P，Nordstrom W，Gish B，Abrams JM，1996. *grim*，a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev.*，10(14)：1 773 – 1 782.

Chen P，Rodriguez A，Erskine R，Thach T，Abrams JM，1998. Dredd，a novel effector of the apoptosis activators reaper，grim，and hid in *Drosophila*. *Dev. Biol.*，201(2)：202 – 216.

Claveria C，Martinez AC，Torres M，2004. A Bax/Bak-independent mitochondrial death pathway triggered by *Drosophila* Grim GH3 domain in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*，279(2)：1 368 – 1 375.

Daish TJ，Cakouros D，Kumar S，2003. Distinct promoter regions regulate spatial and temporal expression of the *Drosophila* caspase dronc. *Cell Death Differ.*，10(12)：1 348 – 1 356.

Deng WM，Bownes M，1997. Two signalling pathways specify localised expression of the *Broad-Complex* in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis. *Development*，124：4 639 – 4 647.

DiBello PR，Withers DA，Bayer CA，Fristrom JW，Guild GM，1991. The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics*，129：385 – 397.

Dorstyn L，Colussi PA，Quinn LM，Richardson H，Kumar S，1999. DRONC，an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase. *Biochemistry*，96(8)：4 307 – 4 312.

Doumanis J，Quinn L，Richardson H，Kumar S，2001. STRICA，a novel *Drosophila melanogaster* caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain，interacts with DIAP1 and DIAP2. *Cell Death Differ.*，8(4)：387 – 394.

Dubrovsky EB，Dubrovskaya VA，Berger EM，2004. Hormonal regulation and functional role of *Drosophila* E75A orphan nuclear receptor in the juvenile hormone signaling pathway. *Dev. Biol.*，268 (2)：258 – 270.

Eystathioy T，Swevers L，Iatrou K，2001. The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori*：hormonal control，ovarian expression and functional properties. *Mech. Dev. May.*，103(1 – 2)：107 – 115.

Fletcher JC，D'Avino PP，Thummel CS，1997. A steroid-triggered switch in E74 transcription factor isoforms regulates the timing of secondary-response gene expression. *Genetics*，94：4 582 – 4 586.

Fraser AG，McCarthy NJ，Evan GI，1997. drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. *The EMBO Journal*，16(20)：6 192 – 6 199.

Grether ME，Abrams JM，Agapite J，White K，Steller H，1995. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev.*，9(14)：1 694 – 1 708.

Haining WN，Carboy-Newcomb C，Wei CL，Stelle H，1999. The proapoptotic function of *Drosophila* Hid is conserved in mammalian cells. *Cell Biology*，96(9)：4 936 – 4 941.

Harvey NL，Daish T，Mills K，Dorstyn L，Quinn LM，Read SH，Richardson Ha，Kumar S，2001. Characterization of the *Drosophila* caspase，DAMM. *J. Biol. Chem.*，276(27)：25 342 – 25 350.

Hawkins CJ，Yoo SJ，Peterson EP，Wang SL，Vernooy SY，Hay BA，2000. The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1，HID，and GRIM. *J. Biol. Chem.*，275(35)：27 084 – 27 093.

Holley CL，Olson MR，Colon-Ramos DA，Kornbluth S，2002. Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nat. Cell Biol.*，4(6)：439 – 444.

Hu S，Yang X，2000. dFADD，a novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J. Biol. Chem.*，275(40)：30 761 – 30 764.

Huang Q，Deveraux QL，Maeda S，Stennicke HR，Hammock BD，Reed JC，2001. Cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*，1 499(3)：191 – 198.

Huet F，Ruiz C，Richards G，1995. Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*：the hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development*，121(4)：1 195 – 1 204 .

Huh JR，Vernooy SY，Yu H，Yan N，Shi GM，Hay BA，2004. Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for *Drosophila* spermatid individualization. *PLoS Biol.*，2 (1)：15.

Igaki T，Yamamoto-Goto Y，Tokushige N，Kanda H，Miura M，2002. Down-regulation of DIAP1 triggers a novel *Drosophila* cell death pathway mediated by dark and DRONC. *J. Biol. Chem.*，277(26)：23 103 – 23 106.

Ijiro T，Urakawa H，Yasukochi Y，Takeda M，Fujiwara Y，2004. cDNA cloning，gene structure，and expression of *Broad-Complex* (*BR-C*) genes in the silkworm，*Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，34：963 – 969.

Jiang C，Lamblin AF，Steller H，Thummel CS，2000. A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol. Cell*，5(3)：445 – 455.

Jones G，Jones D，Zhou Li，Steller H，Chu Y，2000. Deterin，a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*，275(29)：22 157 – 22 165.

Kamimura M，Tomita S，Fujiwara H，1996. Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm，*Bombyx mori*，and its mRNA expression during wing disc development. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*，113(2)：341 – 347.

Kanuka H，Sawamoto K，Inohara N，Matsuno K，Okano H，Miura M，1999. Control of the cell death pathway by Dapaf-1，a *Drosophila* Apaf-1/CED-4-related caspase activator. *Mol. Cell*，4(5)：757 – 769.

Lee CY，Wendel DP，Reid P，Lam G，Thummel CS，Baehrecke EH，2000. E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Mol. Cell*，6(2)：433 – 443.

Leulier F，Rodriguez A，Khush RS，Abrams JM，Lemaitre B，2000. The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep.*，1(4)：353 – 358.

Lisi S，Mazzon I，White K，2000. Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*. *Genetics*，154：669 – 678.

Matsuoka T，Fujiwara H，2000. Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (fl) of *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*，210(3)：120 – 128.

McCall K, Steller H, 1998. Requirement for DCP-1 caspase during *Drosophila* oogenesis. *Science*, 279(5 348): 230 – 234.

McCarthy JV, Dixit VM, 1998. Apoptosis induced by *Drosophila* Reaper and Grim in a human system. *J. Biol. Chem.*, 273(37): 24 009 – 24 015.

Meier P, Silke J, Leevers SJ, Evan GI, 2000. The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. *The EMBO Journal*, 19: 598 – 611.

Mita K, Morimyo M, Okano K, Koike Y, Nohata J, Kawasaki H, Kadono-Okuda K, Yamamoto K, Suzuki MG, Shimada T, Goldsmith MR, Maeda S, 2003. The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(24): 14 121 – 14 126.

Nishita Y, Takiya S, 2004. Structure and expression of the gene encoding a Broad-Complex homolog in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 339: 161 – 172.

Olson MR, Holley CL, Gan EC, Colón-Ramos DA, Kaplan B, Kornbluth S, 2003a. A GH3-like domain in Reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation. *J. Biol. Chem.*, 278(45): 44 758 – 44 768.

Olson MR, Holley CL, Yoo SJ, Huh JR, Hay BA, Kornbluth S, 2003b. Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination. *J. Biol. Chem.*, 278(6): 4 028 – 4 034.

Quinn LM, Dorstyn L, Mills K, Colussi PA, Chen P, Coombe M, Abrams J, Kumar S, Richardson H, 2000. An essential role for the caspase Dronc in developmentally programmed cell death in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 275(51): 40 416 – 40 424.

Reza AM, Kanamori Y, Shinoda T, Shimura S, Mita K, Nakahara Y, Kiuchi M, Kamimura M, 2004. Hormonal control of a metamorphosis-specific transcriptional factor Broad-Complex in silkworm. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 139(4): 753 – 761.

Rodriguez A, Oliver H, Zou H, Chen P, Wang X, Abrams JM, 1999. Dark is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. *Nat. Cell Biol.*, 1(5): 272 – 279.

Schubiger M, Tomita S, Sung C, Robinow S, Truman JW, 2003. Isoform specific control of gene activity *in vivo* by the *Drosophila* ecdysone receptor. *Mechanisms of Development*, 120(8): 909 – 918.

Song Z, McCall K, Steller H, 1997. DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science*, 275(5 299): 536 – 540.

Swevers L, Drevet JR, Lunke MD, Iatrou K, 1995. The silkmoth homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 isoform): cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(7): 857 – 866.

Swevers L, Eystathioy T, Iatrou K, 2002. The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkmoth *Bombyx mori*: hornmonal control and ovarian expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(12): 1 643 – 1 652.

Sun GC, Hirose S, Ueda H, 1994. Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 162(2): 426 – 437.

Thress K, Henzel W, Shillinglaw W, Kornbluth S, 1998. Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. *The EMBO Journal*, 17: 6 135 – 6 143.

Vernooy SY, Chow V, Su J, Verbrugghe K, Yang J, Cole S, Olson MR, Hay BA, 2002. *Drosophila* Bruce can potently suppress Rpr- and Grim-dependent but not Hid-dependent cell death. *Curr. Biol.*, 12(13): 1 164 – 1 168.

Vucic D, Kaiser WJ, Harvey AJ, Miller LK, 1997. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). *Cell Biology*, 94: 10 183 – 10 188.

Vucic D, Kaiser WJ, Miller LK, 1998. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. *Mol. Cell Biol.*, 18: 3 300 – 3 309.

Wang SL, Hawkins CJ, Yoo SJ, Muller HA, Hay BA, 1999. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell*, 98(4): 453 – 463.

White K, Tahaoglu E, Steller H, 1996. Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science*, 271(5 250): 805 – 807.

Wilson R, Goyal L, Ditzel M, Zachariou A, Baker DA, Agapite J, Steller H, Meier P, 2002. The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 4(6): 445 – 450.

Woodard CT, Baehrecke EH, Thummel CS, 1994. Molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell*, 79(4): 607 – 615.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306: 1 937 – 1 940.

Xiong SQ, Zhu XH, 2000. Molecular mechanism of caspases activation and regulation. *Progress of Biochemistry and Biophysics*, 27(1): 33 – 37. [**熊世勤，朱锡华**，2000. Caspases **激活与调控的分子机制**. **生物化学与生物物理进展**. 27(1): 33 – 37]

Yan N, Wu JW, Chai J, Li W, Shi Y, 2004. Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(5): 420 – 428.

Yin VP, Thummel CS, 2004. A balance between the *diap*1 death inhibitor and *reaper* and *hid* death inducers controls steroid-triggered cell death in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 101(21): 8 022 – 8 027.

Yoo SJ, Huh JR, Muro I, Yu H, Wang Lj, Wang S, Renny Feldman RM, Clem RJ, Müller HAJ, Hay BA, 2002. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.*, 4: 416 – 424.

Yussa M, Löhr Ul, Su K, Pick L, 2001. The nuclear receptor Ftz-F1 and homeodomain protein Ftz interact through evolutionarily conserved protein domains mechanisms of development. *Mechanisms of Development*, 107(1 – 2): 39 – 53.

Zhang HW, 2001. Developmental Biology. Beijing: Higher Educational Press. 311 – 318. [**张红卫**，2001. **发育生物学**. **北京：高等教育出版社**. 311 – 318]

（责任编辑：黄玲巧）